

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15777

研究課題名(和文) RNA修飾であるPoly(A)を活用したミトコンドリア機能検査法の確立と臨床応用

研究課題名(英文) Measurement of mitochondrial mRNA polyadenylation as a evaluation method for mitochondrial function

研究代表者

相原 正宗 (Aihara, Masamune)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：30748843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア機能の低下は様々な疾患や老化との関連が明らかにされているが、その機能評価には侵襲的な検体採取を伴うため一般的な検査として普及していない。酸化的リン酸化により産生されるATPを基質とするPoly(A)の定量的解析を侵襲性の少ない新たなミトコンドリア機能評価法として考案し検証を行った。ミトコンドリア機能の低下した細胞内において、ミトコンドリアmRNAのPoly(A)が短縮することを確認し、加えてmRNAの量的変化が引き起こされることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア機能は様々な疾患や老化との関係が示唆されていますが、従来の検査法では侵襲性が高くまた検査自体も熟練を要する難しい手技を含むため、一般的な検査として普及させることは困難です。私たちは本研究を通じて新たなミトコンドリア機能の評価指標に関する知見を得ることができ、今後のミトコンドリア機能検査の発展に必要な知見を得ることができました。

研究成果の概要(英文)：Decreasing in mitochondrial function is associated with various diseases and aging, but its functional evaluation is not widely used because samples used for the test are collected in an invasive manner. As an alternative method used small sample volume, we evaluated the quantitative analysis of mitochondrial mRNA polyadenylation elongated using ATP as a substrate. We confirmed that the mitochondrial mRNAs were polyadenylated shorter in cultured cells with reduced mitochondrial function, as well as its expression levels were partly altered.

研究分野：臨床検査

キーワード：ミトコンドリア Poly(A)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはアデノシン三リン酸(ATP)を産生する主要なオルガネラとして様々な細胞機能に影響を与えている。これまでの研究で老化やパーキンソン病など種々の疾患でミトコンドリア機能の低下に伴う ATP 産生能低下が指摘されており、ミトコンドリア機能の評価は病態の進行や予後など臨床上有益な情報をもたらす可能性を有している。現在のミトコンドリア機能の評価は単離したミトコンドリアの呼吸鎖活性を測定することにより行われているが、作業員間での測定再現性に乏しいことが知られている。また呼吸鎖活性を測定するためには筋肉組織が一定量必要であり侵襲性が高い。ミトコンドリア機能の評価する利点は明らかにされているものの、一般的な検査として普及させるためには測定法における様々な問題を解決しなければならない。

2. 研究の目的

申請者はミトコンドリア DNA から転写される mRNA(ミトコンドリア mRNA)の PolyA は ATP を基質として伸長されることに着目し、呼吸鎖活性が減弱し ATP の産生量が低下したミトコンドリア内ではミトコンドリア mRNA の PolyA の伸長に変化が生じるのではないかと仮説を立てた。本研究ではミトコンドリア mRNA の PolyA がミトコンドリア機能を反映するマーカーになり得るか評価し、少ないサンプル量で測定できる新たなミトコンドリア機能の検査法になり得るか検討を行った。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリアポリ A ポリメラーゼ(MTPAP)遺伝子改変ヒトおよびハエ培養細胞株の樹立
ミトコンドリア mRNA の PolyA の伸長に直接関与するポリメラーゼとして MTPAP の存在が既に明らかにされている。ヒト培養細胞株 HeLa 細胞をもちいて 3 種類の siRNA を用いて MTPAP の遺伝子ノックダウンの条件を確立した。ヒト培養細胞株 HeLa 細胞をもちい、ドキシサイクリン誘導性に MTPAP を過剰発現する安定発現株の単離を行った。どちらの条件においても、MTPAP 特異的抗体を用いて発現変化を評価した。ヒト細胞と同様に、ショウジョウバエ中胚葉由来 S2 細胞を用い、MTPAP shRNA 安定発現株と MTPAP 過剰発現株を単離し、MTPAP 特異的抗体を用いて発現変化を評価した。

(2)ミトコンドリア機能障害細胞の樹立
ミトコンドリア機能障害細胞として、ミトコンドリア DNA 結合タンパク質 TFAM の発現制御ヒト培養細胞株、ミトコンドリア翻訳関連タンパク質 p32 の発現制御ヒト培養細胞株、また PolyA の伸長に関与し、ミトコンドリア機能との関連が示唆されている SUV3 および PNPase の発現制御ヒト・ハエ培養細胞株等を使用した。

(3)ミトコンドリア mRNA の PolyA の測定法
単一のミトコンドリア mRNA を対象とした PolyA の伸長・短縮の簡易判定法として、T4 RNA ライゲースを用いて環状化した RNA を特異的プライマーで増幅し、アナライザーで解析する測定系を確立した。加えて、環状化した RNA を対象に NGS を用いたハイスループット解析の検討を行った。PolyA の測定結果は過去の研究で既に確立した qRT-PCR によるミトコンドリア mRNA の定量解析と組み合わせることで評価を行った。

4. 研究成果

(1) MTPAP 遺伝子改変ヒトおよびハエ培養細胞株を用いた PolyA の測定
MTPAP ノックダウンヒト培養細胞株において、ND5 を除きすべてのミトコンドリア mRNA の PolyA は著しく短縮していることを確認した。また同様に、MTPAP をノックダウンしたハエ培養細胞においてもミトコンドリア mRNA の PolyA は短縮していることが確認された。ヒトおよびハエ培養細胞株ともに MTPAP の過剰発現細胞株では PolyA が伸長していることが示唆される結果を得ることができたが、ノックダウン条件に比べ PolyA の変化は限定的であることが明らかとなった。興味深いことに、MTPAP の発現量変化は PolyA の長短のみではなく、ミトコンドリア mRNA の量的変化にも影響を与えていることが明らかとなった。加えて、MTPAP の増減にともなうミトコンドリア mRNA の量的変化は全ての遺伝子で一律の傾向を示すわけではなく、遺伝子ごとに変化が異なることを見出し、更に生物種間においても異なることを明らかにしている。これらの知見は、ミトコンドリア機能はミトコンドリア mRNA の PolyA の長短だけでなく、その量的変化と併せて解析することでより詳細な評価につながる可能性が示唆された。

(2)ミトコンドリア機能障害細胞を用いた PolyA の測定

ミトコンドリア機能障害細胞においてもミトコンドリア mRNA の PolyA が短縮する傾向にある結果が得られている。しかしながら、ミトコンドリア機能低下の影響を受けミトコンドリア DNA の転写活性が減弱し、PolyA の形成を必要とするミトコンドリア mRNA の総量が低下している影響を受け、PolyA の変化は想定したものよりわずかな差である可能性が示唆されている。検査法として実用化するためには PolyA の変化をより鋭敏に検出できる測定系の再構築が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsushima Yuichi, Hirofuji Yuta, Aihara Masamune, Yue Song, Uchiimi Takeshi, Kaguni Laurie S., Kang Dongchon	4. 巻 7
2. 論文標題 Drosophila protease ClpXP specifically degrades DmLRPPRC1 controlling mitochondrial mRNA and translation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-08088-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----